



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

Instrukcja

Virus Mini AX Transfect

Zestaw o zwiększonej wydajności do izolacji wirusowego DNA do transfekcji.
Procedura z precypitacją DNA.

numer katalogowy	wielkość
060-50T	50 izolacji

Produkt przeznaczony wyłącznie do badań naukowych.

Gwarancja

Firma A&A Biotechnology udziela gwarancji na niniejszy produkt.

Firma nie gwarantuje poprawnego działania produktu w przypadku:

- odstępstwa od dostarczonego wraz z produktem protokołu
- braku zalecanego w niniejszym protokole wyposażenia i materiałów
- użycia innych odczynników niż zalecane lub które nie wchodzi w skład produktu
- użycia przeterminowanych odczynników oraz elementów produktu

Spis treści

Skład	3
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	3
Niezbędne	3
Opcjonalne	3
Protokół	4
Informacje bezpieczeństwa	6

Skład

składnik	50 izolacji	przechowywanie
Kolumny Virus Mini AX	50 szt.	2-8 °C
Probówki 2 ml	50 szt.	15-25 °C
O roztwór oczyszczający	2 x 1,1 ml	-20 °C
L1.4E roztwór lizujący	50 ml	15-25 °C
K1 roztwór równoważący	45 ml	15-25 °C
K2 roztwór płuczający	170 ml	15-25 °C
K3 roztwór elucyjny	60 ml	15-25 °C
PM mieszanina precypitacyjna	45 ml	15-25 °C
TE bufor	5 ml	15-25 °C
Proteinaza K	1,1 ml	2-8 °C

Pojemność minikolumny do oczyszczania DNA wynosi 15 µg.

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

Niezbędne

- Probówki 2 ml typu Eppendorf
- Probówki 15 ml typu Falcon
- 70% etanol
- Inkubator lub termoblok 37 °C, 50 °C (zalecany Thermomixer firmy Eppendorf)
- Mikrowirówka

Opcjonalne

- Woda jałowa (nr kat. 003-075, 003-25)

Protokół

1. Pobrać **600-900 µl** zawiesiny wirionów (DNA wirusa) zawieszonych w niskosolnym buforze (np. buforze TE) (nie ma w zestawie) i przenieść do próbówki 2 ml typu Eppendorf (nie ma w zestawie).
2. Dodać po **40 µl** roztworu oczyszczającego **O**.
3. Wymieszać przez odwracanie próbówki i inkubować przez **30 min** w temp. **37 °C**.
4. Dodać po:
1 objętość roztworu lizującego **L1.4E**, np. do 1 ml zawiesiny wirionów dodać po 1 ml roztworu L1.4E
20 µl **proteiny K**.
5. Całość wymieszać i inkubować przez **15 min** w temp. **50 °C**.
Podczas inkubacji próbki należy od czasu do czasu mieszać przez odwracanie.

Uwaga: W trakcie postępowania proteolizy wirionów, cząsteczki wirusowego DNA przedostają się do roztworu. Należy delikatnie postępować z próbką, aby chronić DNA przed uszkodzeniem mechanicznym. Uszkodzone cząsteczki nie będą funkcjonalne w procesie transfekcji.
6. Podczas inkubacji przygotować kolumny Virus Mini AX będące w probówkach 15 ml.
Nanieść na kolumnę po **800 µl** roztworu równoważącego **K1**. Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
7. Po inkubacji, jeżeli roztwór zlizowanych wirionów jest całkowicie klarowny i pozbawiony osadu, nanieść na zrównoważoną kolumnę.
Poczekać, aż lizat wypłynie z kolumny.

Kolumna pracuje grawitacyjnie. Szybkość przepływu zależy od ilości oraz wielkości cząstek DNA. Duża ilość DNA powoduje spowolnienie przepływu, a przy znacznym przeładowaniu kolumny może dojść nawet do całkowitego jej zablokowania. W takim przypadku należy wirować kolumny wraz z probówkami w rotorze uchylnym przez 1 min przy 3000-4000 RPM. Wirowanie można przeprowadzić zarówno po naniesieniu próbek (pkt 7) jak i podczas płukania roztworem płuczącym K2 (pkt 8 i 9) i przy elucji roztworem elucyjnym K3 (pkt 10).
8. Nanieść na kolumnę po **1,5 ml** roztworu płuczącego **K2**.
Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
9. Ponownie nanieść na kolumnę po **1,5 ml** roztworu płuczącego **K2**.
Poczekać, aż roztwór wypłynie z kolumny.
10. Nanieść na kolumnę po **100 µl** roztworu elucyjnego **K3**.
Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny.

Uwaga: Ten krok ma na celu zmniejszenie całkowitej objętości eluatu, gdyż martwa objętość kolumny wynosi 100 µl.

11. Przenieść kolumnę do próbki precypitacyjnej **2 ml** (w zestawie).

Uwaga: Kolumna posiada odpowiednie żeberka pozwalające na łatwe umieszczenie jej w próbce.

12. Nanieść na kolumnę po **1 ml** roztworu elucyjnego **K3**.
Poczekać, aż eluat wypłynie z kolumny. Usunąć kolumnę.

13. **Uwaga:** Mieszanina precypitacyjna PM zawiera dodatkowo wzmacniacz precypitacji, dlatego przed użyciem należy ją wymieszać przez kilkakrotne odwracanie butelki.

Do eluatów dodać po **800 µl** mieszaniny precypitacyjnej **PM**.

14. Wymieszać i wirować przez **10 min** przy **10 000 RPM**.

Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.

15. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.

Uwaga: W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej próbki, tak aby można było go odzyskać.

16. Dodać po **500 µl 70% etanolu** (nie ma w zestawie).
Całość wymieszać i wirować przez **3 min** przy **12 000 RPM**.

Na dnie powinien być widoczny jasnoniebieski osad DNA.

17. Ostrożnie zlać supernatant, tak aby nie usunąć niebieskiego osadu DNA.

Uwaga: W trakcie zlewania supernatantu łatwo wylać osad DNA. Dla bezpieczeństwa zaleca się wylewać supernatant do przygotowanej próbki, tak aby można było go odzyskać.

18. Odwrócić próbkę z osadem DNA i suszyć odwróconą do góry dnem przez **5 min** w **temp. pokojowej**.

Uwaga: Jeżeli na ściankach próbki wciąż znajdują się resztki alkoholu, należy je osuszyć przy pomocy patyczków higienicznych.

Uwaga: Nie przedłużać suszenia osadu, aby nie przesuszyć DNA. Może to spowodować znaczące obniżenie wydajności izolacji DNA, a tym samym późniejszej transfekcji.

19. Zawiesić osad DNA w odpowiedniej ilości buforu **TE** (w zestawie) lub **wody jałowej wolnej od nukleaz** (nie ma w zestawie).

Niebieska barwa osadu umożliwi śledzenie procesu rozpuszczania DNA.

20. Oczyszczone DNA przechowywać w temp. **-20 °C** do czasu dalszych analiz.

Informacje bezpieczeństwa



NIEBEZPIECZEŃSTWO

Proteinaza K

H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H334 Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania.
 H335 Może powodować podrażnienie dróg oddechowych.
 P261 Unikać wdychania pyłu.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.
 P342+P311 W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego skontaktować się z Ośrodkiem Zatruc lub lekarzem.



UWAGA

L1.4E roztwór lizujący

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
 H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



UWAGA

K1 roztwór równoważący

H302 Działa szkodliwie po połknięciu.
 H315 Działa drażniąco na skórę.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

K2 roztwór płuczący

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

K3 roztwór elucyjny

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



NIEBEZPIECZEŃSTWO

PM mieszanina precypitacyjna

H225 Wysoce łatwopalna ciecz i pary.
 H319 Działa drażniąco na oczy.
 H336 Może wywoływać uczucie senności lub zawroty głowy.
 P210 Przechowywać z dala od źródeł ciepła, gorących powierzchni, iskrzenia, otwartego ognia i innych źródeł zapłonu. Palenia wzbronione.
 P261 Unikać wdychania par.
 P305+P351+P338 W przypadku dostania się do oczu: ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać.



A&A BIOTECHNOLOGY
innovating life science

A&A Biotechnology, ul. Strzelca 40, 80-299 Gdańsk
tel. 883 323 761, 600 776 268
info@aabiotech.com, www.aabiotech.com

wersja 2023-1

